陈院真,司友斌,党 菲,等. AgNP 叶面和根系暴露对大豆(Glycine max L. xudou16)吸收及转运的影响[J]. 农业环境科学学报, 2016, 35(12): 2285-2291.

CHEN Yuan-zhen, SI You-bin, DANG Fei, LI Min, et al. Effect of foliar and root exposure of AgNP on the uptake and translocation of soybean(Glycine max L. xudou16)[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2016, 35(12): 2285–2291.

# AgNP 叶面和根系暴露对大豆(Glycine max L. xudou16) 吸收及转运的影响

陈院真1.2, 司友斌1\*, 党 菲2, 李 敏2, 周东美2

(1.安徽农业大学资源与环境学院,合肥 230036; 2.中国科学院南京土壤研究所土壤环境与污染修复重点实验室,南京 210008)

**摘 要**:为准确评估释放到农田生态系统中的纳米银(AgNP)对作物生长的影响,选取大豆(Glycine max L. xudou16)为对象,分别在 叶面暴露、根系暴露以及叶面和根系综合暴露途径下连续 14 d 暴露 AgNP(10 mg·L<sup>-1</sup>)及 AgNO<sub>3</sub>(1 mg·L<sup>-1</sup>),考察大豆对 AgNP 及 AgNO<sub>3</sub> 的吸收和转运。研究结果发现:三种暴露途径下大豆新叶中积累的 Ag 为 0.06~1.03 μg·g<sup>-1</sup>,单独叶面暴露下大豆根部积累的 银为 1.07~1.47 μg·g<sup>-1</sup>,表明 AgNP 能够被大豆吸收并发生转运。对比叶面暴露和根系暴露发现,根系暴露途径下 Ag 的迁移系数高 于叶面暴露的迁移系数(64.5~140 倍);无论哪种暴露途径,AgNO<sub>3</sub>处理的迁移系数均大于 AgNP 处理(2.5~25 倍),表明除了暴露途 径的影响,Ag 的形态(即 AgNP 或 AgNO<sub>3</sub>)也会影响大豆新叶中 Ag 的积累。因此,在评估 AgNP 对农作物生长的风险时,应综合考虑 其暴露途径和 Ag 的形态。

关键词:AgNP;大豆;吸收;转运

中图分类号:X503.231 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2016)12-2285-07 doi:10.11654/jaes.2016-0912

Effect of foliar and root exposure of AgNP on the uptake and translocation of soybean(Glycine max L. xudou16)

CHEN Yuan-zhen<sup>1,2</sup>, SI You-bin<sup>1\*</sup>, DANG Fei<sup>2</sup>, LI Min<sup>2</sup>, ZHOU Dong-mei<sup>2</sup>

(1.School of Resources and Environment, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China; 2.Key Laboratory of Soil Environment and Pollution Remediation, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China )

Abstract: In order to access accurately the impact of released AgNP on crops growth into the farmland ecosystem, a soybean (Glycine max L. xudou16) was treated as the testing plant, exposed by AgNP(10 mg·L<sup>-1</sup>) and AgNO<sub>3</sub>(1 mg·L<sup>-1</sup>) in routes of foliar, root and their combined exposure for 14 days respectively. Irrespective of exposure routes, Ag accumulation in new leaves (which were not exposed to AgNP) were 0.06~1.03  $\mu$ g·g<sup>-1</sup> in above three exposure routes, while Ag accumulation in roots were 1.07~1.47  $\mu$ g·g<sup>-1</sup> in foliar exposure route, indicating that AgNP could be taken up and translocated within the soybean. Compared with the transfer efficient of Ag by foliar exposure sure, those by root exposure were much higher (64.5~140 times). In all exposure routes, the transfer efficient of AgNO<sub>3</sub> treatment was higher than that of AgNP treatment(2.5~25 times), suggesting that both the exposure route and the silver species(AgNP or AgNO<sub>3</sub>) affected the accumulation of Ag in soybean leaves. Consequently, both of the exposure route and Ag species should be concerned when accessing the risk of AgNP on crops groth.

Keywords: nanosilver; soybean; uptake; transport

收稿日期:2016-07-12

基金项目:国家自然科学基金重点项目(41430752)

作者简介:陈院真(1991—),女,汉族,安徽潜山人,硕士研究生,主要从事重金属对动植物生物有效性方面的研究。E-mail:yzchen1246@163.com

<sup>\*</sup> 通信作者:司友斌 E-mail:youbinsi@ahau.edu.cn

近年来,纳米技术得到了迅猛发展。纳米材料是 指在三维空间中至少有一维处于纳米尺度范围(1~ 100 nm)的颗粒或以这些颗粒为基本单元所构成的材 料<sup>[1]</sup>。因具有优良的抗菌性能,纳米银(AgNP)是目前 最常见的纳米材料之一。据相关报道,约有 25%的纳 米产品中含有 AgNP<sup>12-3</sup>。AgNP 兼具 Ag 元素和纳米材 料的特性,广泛应用于卫生、医疗、保健、食品、化妆 品、纺织品、环保材料、涂料等诸多领域<sup>[4]</sup>。AgNP 的大 量使用导致其不可避免地释放到自然环境中,并进入 生态系统<sup>[5-8]</sup>。AgNP 进入农田生态系统后可能对作物 产生潜在风险,并通过食物链向高营养级传递和富 集。因此,有必要研究作物对 AgNP 的吸收和累积。

大量研究表明, AgNP 能够被植物根部吸收<sup>[9-11]</sup>。 此外,还有学者就 AgNP 对植物根部根瘤菌的影响进 行了研究,如 Abd-Alla 等<sup>122</sup>发现,在土壤中 AgNP 的 含量为800 µg·kg<sup>-1</sup>时,蚕豆的发芽率减少了40%,并 且根部的根瘤菌发生衰老、细胞恶化,固氮酶活性降 低; Hossain 等<sup>[13]</sup>、Mustafa 等<sup>[14]</sup>研究了 AgNP 对大豆的 蛋白组学的影响。国内关于 AgNP 对植物的吸收主要 集中在 AgNP 对种子的萌发、生殖生长的影响。Yin 等<sup>169</sup>对 11 种湿地植物的研究发现, AqNP 粒径大小和 培养环境一定程度影响种子萌发; 王荣等<sup>10</sup> 研究了 AqNP 对黑麦草生长特性的影响,结果表明 AqNP 显 著降低了黑麦草根系总长度、活力和根尖数;Cui 等<sup>177</sup> 研究了 AgNP 对黄瓜和小麦的毒性,表明在较高暴露 浓度情况下,AgNP和 Ag\*对小麦和黄瓜都具有明显 的毒性,并且两种植物在营养生长阶段比萌发阶段对 AgNP 的毒性更敏感;彭小凤等<sup>109</sup>研究 AgNP 对拟南 芥生殖生长的影响发现,2.5 mg·L<sup>-1</sup>的 AgNP 处理后, 拟南芥的抽薹及开花时间均有推迟,且果荚发育也受 到阻碍。这些均是基于根系暴露的基础上展开的研 究,而对叶面暴露的研究较少。

事实上,AgNP已被报道作为植物的杀虫剂使用。 例如,黑麦草叶面喷施含 AgNP的杀虫剂后,有效减 少了真菌病的发生<sup>109</sup>。Lamsal等<sup>201</sup>发现,通过给黄瓜 和南瓜喷施 AgNP,能够有效预防白粉病。植物可以通 过叶片或者根系吸收环境中的纳米材料<sup>121</sup>,在不同的 暴露途径下,植物的吸收能力可能不同,且导致其在 植物体内的转运和分配不同。Larue等<sup>122</sup>在莴苣叶面 喷施 AgNP,发现 AgNP 能够通过叶片气孔进入到莴 苣叶脉中,并发生积累和转运;Dimkpa等<sup>123</sup>通过小麦 根系暴露 AgNP 发现其能够从小麦根部转运到小麦

#### 农业环境科学学报 第 35 卷第 12 期

目前未见两种暴露途径的对比性研究报道。

本研究以大豆(Glycine max L. xudou16)为试验作物,采用水培方式,比较不同暴露途径下(叶面暴露、根系暴露、叶面和根系综合暴露)大豆对 AgNP 的吸收、累积和分布的差异,以期为深入研究 AgNP 对植物有效性和毒性提供基础数据。

## 1 材料与方法

## 1.1 试验材料

AgNP 的合成材料包括:硝酸银(AgNO<sub>3</sub>,>99.5%), 盐酸羟胺(NH<sub>2</sub>OH·HCI,>98.5%),氢氧化钠(NaOH,> 99.5%),聚丙烯吡咯烷酮(PVP,分子量 58 000)。试验 所用营养液参照文献[11],具体成分包括 0.28 mmol·  $L^{-1}$  Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>0.12 mmol·L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>5.0 µmol·  $L^{-1}$  KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1 mmol·L<sup>-1</sup> CaSO<sub>4</sub> 0.15 mmol·L<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.1 mmol  $\cdot$ L <sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>  $\cdot$ 7H<sub>2</sub>O 0.01 mmol  $\cdot$ L <sup>-1</sup> FeSO<sub>4</sub>  $\cdot$ 7H<sub>2</sub>O、0.01 mmol·L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>-EDTA·2H<sub>2</sub>O 以及微量元素 3.0  $\mu$ mol ·L <sup>-1</sup> H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 1.0  $\mu$ mol ·L <sup>-1</sup> MnSO<sub>4</sub> ·H<sub>2</sub>O 1.0  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup> ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>0.02  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>20.05 µmol·L<sup>-1</sup> CuSO₄·5H<sub>2</sub>O(pH=5.6)。以上药品均为分析 纯,购自国药集团化学试剂有限公司。试验所用水均 为超纯水(18.2 M $\Omega$ , Millipore, Bedford, USA)。浓硝酸 (优级纯)购自上海安谱实验科技股份有限公司。试验 过程中所用到的器皿在使用前均经10%硝酸浸泡清 洗。试验所用大豆(Glycine max L. xudou16)购自徐州 农业科学研究所。

#### 1.2 AgNP 的制备及表征

试验中采用一种稳定性好、重复性高的方法合成 AgNP<sup>[24]</sup>。具体步骤如下:将 10 mL 0.01 mol·L<sup>-1</sup> AgNO<sub>3</sub> 在磁力搅拌下加入到 90 mL 含 1.67×10<sup>-3</sup> mol·L<sup>-1</sup> NH<sub>2</sub>OH·HCI和 3.33×10<sup>-3</sup> mol·L<sup>-1</sup> NaOH 溶液中,溶液 颜色迅速由无色变为黄色。反应 2~3 min 后向上述溶 液中缓慢加入 0.3 g 的 PVP,继续搅拌 8 h,搅拌过程 中容器用锡箔纸进行避光处理。搅拌 8 h 后 4000×g 下超滤离心(3 kDa, Amicon Ultra-15, Millipore, USA) 30 min,滤去剩余的反应产物,用超纯水反复清洗滤 膜,收集上层液体,于4℃避光保存。

采用 BI-200SM 光散射仪(Brookhaven Instru ments, American)对合成的 AgNP 进行水合粒径及 ζ 电位分析,使用透射电镜(TEM, JEM-200CX, Japan)进行尺寸及晶格条纹的分析。由于量子尺寸效应, AgNP 具有独特的非线性光学效应,在紫外-可见光 光谱表现出特征吸收峰,因此采用紫外-可见光谱法

对合成的 AgNP 进行 UV-Vis 吸收光谱测定,分析其特征峰。合成的 AgNP 母液在试验前均于三频数控超声波清洗器(KQ-300VDE,China)中 45 kHz 超声 15 min,使其分散均匀。

对合成的 AgNP 溶液进行总 Ag 含量的测定:向 AgNP 溶液中按照 1:1 体积比加入浓硝酸并于 25 ℃ 消解 12 h,过 0.1 mol·L<sup>-1</sup> Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 预饱和的聚醚枫 滤头<sup>[25]</sup>(0.22 µm, America),采用火焰原子吸收分光 光度计(F-AAS; Hitachi Z-2000, Japan)测定溶液中 总 Ag 含量。

#### 1.3 大豆育苗及培养

选择饱满一致的种子,用 0.5%的 NaClO<sub>4</sub> 溶液对 种子进行杀菌消毒(30 min),经超纯水(18.2 M $\Omega$ , Millipore)反复清洗干净后,在超纯水中浸泡 4 h。将 种子转移到铺有湿润滤纸的托盘,在 25 °C、湿度为 80%的黑暗条件下催芽。3 d 后将发芽的种子转移至 植物培养箱(MLR-351H,SANYO)中培养 21 d。培养 条件为 14 h 光照、25 °C,10 h 黑暗、20 °C,湿度为 80%。营养液每 3 d 更换一次。

#### 1.4 植株 AgNP 暴露处理

试验设置 7 个处理(表 1),分别为空白对照(CK)、 叶面暴露 AgNP(Foliar - NP 10)、叶面暴露 AgNO<sub>3</sub> (Foliar - Ag<sup>+</sup> 1)、根系暴露 AgNP(Root - NP 10)、根系暴 露 AgNO<sub>3</sub>(Root - Ag<sup>+</sup> 1)、综合暴露 AgNP(Foliar + Root -NP 10)和综合暴露 AgNO<sub>3</sub>(Foliar + Root - Ag<sup>+</sup> 1)。每个 处理均设置 3 个平行。其中,AgNP 浓度设置为 10 mg·L<sup>-1</sup>,该浓度虽然高于环境浓度<sup>[26]</sup>,但根据美国环境 保护局(EPA,2009)调查的污泥中 AgNP 浓度和污泥 农田施用量,推测施用污泥 10 年后土壤 AgNP可累 积到 10 mg·kg<sup>-1</sup>,且该浓度基于已见诸报道文献<sup>[23,27]</sup>; AgNO<sub>3</sub> 浓度设置为 1 mg·L<sup>-1</sup>,对应于营养液中 AgNP 溶出的溶解态 Ag<sup>+</sup>浓度。

筛选长势一致的大豆幼苗移栽至 HDPLE 塑料盆 钵,每盆 2 株,所有盆钵均用黑色材料进行避光处理。 对于叶片暴露处理,大豆幼苗培养于不含 AgNP 或 AgNO<sub>3</sub> 的营养液中,用消毒棉签将 Ag 溶液(10 mg·L<sup>-1</sup> AgNP 或 1 mg·L<sup>-1</sup> AgNO<sub>3</sub>)均匀涂抹于大豆第 Ⅲ 节叶 片的上表面。涂抹时将其他叶片用黑色塑料袋包裹, 盆钵用铝箔纸包裹,防止交叉污染;通过测定其他叶 片的 Ag 累积,研究 Ag 在大豆体内的吸收和分布,避 免叶片表面 Ag 吸附对其含量测定的影响。每天涂抹 3 次(早、中、晚各 1 次,3 次的时间间隔相同),每天使 用新鲜配置的 Ag 溶液 25 mL(大于根系的吸收量), 涂抹后对营养液取样,分析测定 Ag 含量,发现 Ag 含量低于检测限,说明叶片涂抹过程中根系营养液没有受到 Ag 污染。对于根系暴露处理,将大豆幼苗暴露 于含 10 mg·L<sup>-1</sup> AgNP 或 1 mg·L<sup>-1</sup> AgNO₃ 的营养液,且 每 3 d 更换暴露溶液,同时用不含 AgNP 或者 AgNO₃ 的营养液对第Ⅲ节叶片进行涂抹。对于叶面+根系暴露处理,大豆幼苗同时通过叶片及根系吸收 AgNP 或 AgNO₃,操作方法同上。试验暴露 14 d,在第 7、14 d 分别采集植物组织进行分析。

#### 1.5 样品收获及 Ag 含量测定

暴露 7 d 后收获大豆第Ⅲ~Ⅳ 节叶片,称重后依次用超纯水、10 mmol·L<sup>-1</sup> HNO<sub>3</sub>和 10 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA 浸泡 10 min,最后再用超纯水冲洗<sup>[28]</sup>。暴露 14 d 后采 集第 I ~ II 节和第 Ⅶ节叶片(对于叶面暴露处理而 言,该叶片直接接触暴露溶液),同时收集叶片暴露 处理的根系,称重后依照上述方法进行清洗。所有样 品 105 ℃杀青 15 min,70 ℃烘至恒重。为方便讨论, 后文中将第 I ~ II 节和第 Ⅲ~Ⅳ 节叶片简称为"新 叶",将第 Ⅶ节叶片简称为"老叶"。对于叶面暴露途 径而言,老叶是直接暴露于 AgNP 或 AgNO<sub>3</sub> 的叶片, 而新叶则未直接暴露于 Ag。

依照 EPA2001b 的方法,使用微波消解仪(Ethos one, Milestone, Italy)对样品用浓 HNO<sub>3</sub> 进行微波消解,过 0.1 mol·L<sup>-1</sup> Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 预饱和的 0.22  $\mu$ m 滤头, 采用 ICP-MS(iCAP Q, Thermo Scientific, USA)对大豆 组织 Ag 含量进行测定,同时消煮空白与标准物质 (柑橘叶, GBW10020)进行质控。测定结果显示标准 物质的回收率为 99.2%±8.3%,达到试验精度要求。1.6 统计分析

采用 Nanomeasurer 统计合成的 AgNP 在透射电 镜下观测的粒径分布数据,采用 SPSS16.0 软件中的 单因素统计(One-way ANOVA)分析第7、14 d 不同处

表 1 大豆暴露试验处理 Table 1 The design of soybean exposure experiment

暴露	おして田	Ag 形态	暴露浓度/ mg·L <sup>-1</sup>	样品采集	
途径	处埋			第 7 d	第 14 d
_	СК	_	—		
叶面	Foliar NP10	AgNP	10		
	Foliar Ag <sup>+</sup> 1	$AgNO_3$	1	第Ⅲ~Ⅳ节	第Ⅰ~Ⅱ节叶
根系	Root NP10	AgNP	10	叶(新叶)	(新叶)、 笹Ⅲ 甘叶(老
	Root Ag⁺ 1	$AgNO_3$	1		叶)、根系
综合	Foliar+Root NP10	AgNP	10		
	Foliar+Root Ag <sup>+</sup> 1	$AgNO_3$	1		

理间的显著性差异(P<0.05),采用双因素统计(Two-way ANOVA)分析暴露途径与 Ag 形态对大豆总 Ag 浓度的影响,采用 Origin8.5 软件作图。数据表示为平均值±标准差。

# 2 结果与分析

## 2.1 AgNP 的表征

试验合成的 AgNP 为球形(图 1a),其平均粒径为 41.0±10.5 nm(图 1b,水分散相),且具有规整的晶格 排列,其晶格间距为 0.236 nm(图 1c),对应于 Ag 的 (111)晶面。动态光散射(DLS)分析结果表明其水合 粒径为 45.8±4.3 nm,并且 AgNP 颗粒表面带有负电 荷,ζ 电势为-38.7±0.2 mV(pH=4.2)。本试验中合成的 AgNP 母液在 412 nm 出现了 AgNP 的特征吸收峰(图 1d)。母液的总 Ag 浓度为 126.8±10.9 mg·L<sup>-1</sup>,后续试验 中将母液逐级稀释,达到暴露试验所需要的浓度。

# 2.2 大豆新叶的总 Ag 浓度

在空白处理的大豆新叶中没有检测到 Ag(<0.3 ng·g<sup>-1</sup>),而其他处理的大豆新叶中 Ag 含量显著性增加(P<0.05)。暴露 7 d 后,新叶总 Ag 浓度范围为0.28~ 0.68 μg·g<sup>-1</sup>(图 2),并且 Root-Ag<sup>+</sup>1 和 Foliar + Root-Ag<sup>+</sup>1 处理新叶总 Ag 浓度是其他处理的 1.9~2.3 倍

(One-way ANOVA, P<0.05)。双因素方差分析的统计 结果表明,暴露 7 d 后,Ag 形态(即 Ag<sup>+</sup> vs. AgNP,P< 0.001)比暴露途径(叶面暴露 vs.根系暴露,P>0.05)对 新叶总 Ag 浓度影响更大。暴露 14 d 后,新叶总 Ag 浓 度范围为 0.06~1.03 μg·g<sup>-1</sup>(图 2),且不同处理间存在显 著差异:Root-Ag<sup>+</sup> 1 处理浓度最高(1.03±0.14 μg·g<sup>-1</sup>), 分别是 Foliar Ag<sup>+</sup> 1、Foliar-NP 10、Root-NP 10、Foliar+ Root-NP 10 处理的 52、7.92、1.75、3.12 倍。双因素方 差分析的统计结果表明 Ag 形态(即 Ag<sup>+</sup> vs. AgNP)和 暴露途径(叶面暴露 vs.根系暴露)均会影响新叶总 Ag 浓度(P<0.01)。

对比各处理 7 d 和 14 d 的结果发现,Foliar-NP 10 和 Foliar Ag<sup>+</sup>1 处理的总 Ag 浓度随暴露时间增加 而显著下降(P<0.05)。这可能是随着暴露时间的增 加,叶面暴露途径下老叶所受的损伤越来越强,减弱 了其向上迁移的能力,也有可能是随着大豆的生长, 一部分 Ag 通过某种途径而被排出。而 Root-NP 10 和 Root-Ag<sup>+</sup>1 处理的总 Ag 浓度随时间增加而逐渐增 加,与 Foliar + Root-NP 10 和 Foliar + Root-Ag<sup>+</sup>1 处理 趋势相同。

对于 AgNP 或 AgNO<sub>3</sub> 处理,大豆新叶通过根系暴 露累积的 Ag 浓度与通过综合暴露累积的 Ag 浓度相



Figure 1 TEM image(a), particle size distribution(b), lattice-fringe fingerprinting image(c) and UV-Vis(d) of AgNP in stock solution

#### 农业环境科学学报 第 35 卷第 12 期

#### 陈院真,等:AgNP 叶面和根系暴露对大豆(Glycine max L. xudou16) 吸收及转运的影响



图中不同小写和大写字母分别表示暴露 7 d 和 14 d 后各处理的 Ag 浓度存在显著差异(P<0.05) Different lower-case and upper-case letters indicated a significant

difference at P<0.05 among treatments of soybean exposed to Ag for 7 d and 14 d, respectively

# 图 2 暴露 7 d 和 14 d 后大豆新叶中总 Ag 浓度 Figure 2 Total Ag concentrations in new leaves after 7 d or 14 d exposure

近,高于通过叶面暴露累积的 Ag 浓度。这说明在该 试验条件下,大豆根部吸收并转运 Ag 的效率高于叶 面吸收转运的效率。

#### 2.3 大豆老叶的总 Ag 浓度

暴露第 14 d 大豆老叶中总 Ag 的浓度如表 2 所示。经过连续 14 d 涂抹 10 mg·L<sup>-1</sup> AgNP 后,老叶的总 Ag 积累量达到 75.92±12.28 μg·g<sup>-1</sup>,而涂抹 1 mg·L<sup>-1</sup> AgNO<sub>3</sub> 后老叶的总 Ag 积累量为 6.28±1.08 μg·g<sup>-1</sup>,两 者具有显著性差异(P<0.01)。这可能是由于 AgNP 和AgNO<sub>3</sub>施用浓度不同所致。值得注意的是,尽管经 过了清洗,仍然较难区分吸附于叶片表面的 Ag 和内 化的 Ag,因此本研究中叶面暴露的老叶中 Ag 积累量 可能被高估。通过根系暴露 10 mg·L<sup>-1</sup> AgNP 和 1 mg·L<sup>-1</sup> AgNO<sub>3</sub> 的大豆老叶总 Ag 浓度分别为 2.00±0.43 μg·g<sup>-1</sup> 和 1.32±0.51 μg·g<sup>-1</sup>,差异不显著(P>0.05)。这 说明在根系暴露途径下,AgNP 很可能以溶解态形式 被吸收。总体而言,综合暴露途径下大豆老叶总 Ag 浓度和叶面暴露的总 Ag 浓度相近,且显著高于根系 暴露的总 Ag 浓度。

通过计算 Ag 从老叶到新叶的迁移系数(定义为 新叶中 Ag 浓度与老叶中 Ag 浓度之比,表 2),发现无 论哪种暴露途径 AgNO<sub>3</sub> 处理的迁移系数均大于 AgNP 处理(2.53~25 倍),而且叶面暴露途径 Ag 的迁移系 数远低于相应的根系暴露,例如叶面暴露 AgNP 和 AgNO<sub>3</sub> 处理的迁移系数分别为 0.002±0.000 3 和 0.011±0.000 8,对应的根系暴露分别为 0.28±0.13 和

表 2 暴露 14 d 后大豆老叶中的总 Ag 浓度						
Table 2 Total Ag concentration in old leaves of soybean after						
exposure for 1/ days						

exposure for 14 days								
暴露的 Ag 形态	处理	老叶中总 Ag 浓度 µg•g⁻¹	/ 老叶到新叶的 迁移系数					
_	СК	_	_					
AgNP	Foliar-NP 10	75.92±12.28a	0.002±0.000 3					
	Root-NP 10	2.00±0.43b	0.28±0.13					
	Foliar+Root-NP 10	87.92±4.65a	$0.004 \pm 0.0005$					
AgNO <sub>3</sub>	Foliar-Ag⁺ 1	6.28±1.08a	0.011±0.000 8					
	Root-Ag⁺ 1	$1.32\pm0.51b$	0.71±0.16					
	Foliar+Root-Ag <sup>+</sup> 1	10.96±4.32a	0.10±0.04					

注:表中不同的小写字母表示同一种 Ag 形态(AgNP 或 AgNO<sub>3</sub>)暴露 14 d 后各处理间的 Ag 浓度存在显著差异(P<0.05)。

Note:Different lower-case indicated a significant difference at P<0.05 among treatments within each Ag form(i.e., AgNP or AgNO<sub>3</sub>) after soybean exposed 14 d.

0.71±0.16。综合暴露途径的迁移系数则介于叶面暴露 与根系暴露的迁移系数之间。

#### 2.4 大豆根部的总 Ag 浓度

经过 14 d 暴露后,相对于空白对照(未检测到 Ag),经 AgNP 和 AgNO<sub>3</sub> 叶面暴露的大豆根部总 Ag 浓 度分别为 1.07±0.13 µg·g<sup>-1</sup> 和 1.47±0.54 µg·g<sup>-1</sup>,同时叶 面暴露途径下营养液中未检测到 Ag(<5 ng·L<sup>-1</sup>),说明 AgNP 或 AgNO<sub>3</sub> 经叶面暴露后转运到了根部。通过计 算 Ag 在大豆组织中的迁移系数(表 3)发现,无论暴露 液中 Ag 为何种形态,Ag 从老叶到根系的迁移系数均 远大于老叶到新叶的迁移系数,说明 Ag 经叶面暴露 吸收后,可能更倾向于向地下部转运。对此尚需要进一 步深入研究。

## 3 讨论

经 AgNP 暴露后,我们在大豆叶、根中检测到了 Ag,与杨新萍等<sup>[29]</sup>关于纳米颗粒能够在植物组织器官

表 3 叶面暴露途径下根部总 Ag 浓度及老叶的迁移系数 Table 3 Total Ag concentration of root and transfer efficient of old leaves with foliar exposure

	根部总 Ag 浓 度/ μg∙g⁻¹	与对照的 差异性	迁移系数		
处理			老叶到新叶	老叶到根系	
СК	ND	_	—	_	
Foliar-NP10	1.07±0.13	P<0.05	$0.002 \pm 0.000$ 3	$0.014 \pm 0.004$	
Foliar-Ag⁺-1	1.47±0.54	P<0.01	0.011±0.000 8	$0.228 \pm 0.056$	

注:ND 表示没有检测到 Ag; 迁移系数定义为第 14 d 大豆其他部 位的 Ag 浓度与老叶中 Ag 浓度之比。

Note: ND was not detected Ag. Transfer efficient was defined as the ratio of the concentration of silver in other parts and in old leaves. 中积累的结论一致。但是,目前尚不清楚 AgNP 是以颗粒还是以溶解的 Ag\*形式被大豆吸收。本试验利用 TEM-EDS 观察新叶组织中的纳米颗粒,但由于叶片 中 Ag 的浓度远低于仪器检测限(0.1%~0.5%),最终 没有得到相应结果。已有研究中,Lee 等<sup>[30]</sup>用TEM-EDS 在绿豆和高粱中发现了 AgNP,Dimkpa 等<sup>[23]</sup>用 TEM 在小麦体内首次发现了纳米颗粒的 Ag。此外,基 于同步辐射技术的 X 射线近边吸收精细结构(X-ray absorption near edge structure, XANES)分析也可以提 供样品中纳米颗粒信息,如 Wang 等<sup>[11]</sup>采用 XANE 技 术研究了 AgNP 以及 Ag<sub>2</sub>S-NPs 在豇豆和小麦体内的 形态与分布。

试验中考察了叶面暴露、根系暴露、综合暴露途 径下 AgNP 在大豆体内的累积和转移。不管哪种暴露 途径,AgNP 均能被大豆吸收。Hong 等<sup>[31]</sup>研究了黄瓜 在含纳米 CeO2 粉末的气溶胶沉降及喷施含纳米 CeO2 溶液两种不同暴露方式下植株内 Ce 的转运过 程,结果表明,无论哪种暴露形式,纳米 CeO2 都能够 进入到黄瓜体内并发生转运,特别是 Ce 可以由叶片 运输到黄瓜的其他部位。这与我们的研究结果一致, 暴露途径不同,植物吸收 AqNP 方式也不同。Eichert 等<sup>[32]</sup>研究发现, AgNP 经过叶面喷施途径进入生菜体 内主要是通过角质层和气孔,然后进入到上皮、叶肉 及维管束组织当中。Geisler-Lee 等<sup>19</sup>在研究 AqNP 对 拟南芥生长的影响(根系暴露)中发现,AgNP 在被根 吸收的过程中,先后通过外缘细胞、根冠、上皮细胞 及小柱细胞,再进入顶端分生组织的初始细胞。本研 究中进入植物体内的 Ag 能够向其他组织转移(如新 叶、根系等),并且根系暴露处理向新叶的迁移系数 高于叶面暴露处理的迁移系数,其具体机制有待进 一步研究。

本研究结果表明,Ag的形态也会影响其在大豆体内的累积和转运:叶面暴露 10 mg·L<sup>-1</sup> AgNP 和 1 mg·L<sup>-1</sup> AgNO<sub>3</sub> 后,新叶 Ag 的积累量没有明显差异,而根系暴露及综合暴露途径下,AgNO<sub>3</sub> 处理的积累量明显大于 AgNP 处理;无论哪种暴露途径,AgNO<sub>3</sub> 处理的迁移系数均大于 AgNP 处理。这说明溶解态的 Ag容易被植物吸收。Wang 等<sup>[33]</sup>在白杨和拟南芥暴露AgNP的研究中发现,Ag<sup>+</sup>处理比 AgNP 处理更容易导致 Ag 在白杨体内积累。这表明植物吸收 AgNP 的可能机制之一是其吸收 AgNP 缓慢溶解出来的 Ag<sup>+</sup>。由于 Ag<sup>+</sup>毒性更强,被植物吸收的 Ag<sup>+</sup>在植物体内也有可能再次转化为有利于自身的毒性更小的 AgNP。

#### 农业环境科学学报 第 35 卷第 12 期

Dimkpa 等<sup>[28</sup>发现无论是 AgNP 处理还是 AgNO<sub>3</sub> 处理, 最后均在小麦体内发现了纳米颗粒的 Ag。目前关于这 些方面的研究还没有明确的结论,需要进一步探讨。

## 4 结论

无论是通过叶面暴露还是根系暴露途径,AgNP 均能够被大豆吸收并发生转运。根系暴露途径下Ag 的迁移系数高于叶面暴露的Ag的迁移系数,但无论 哪种暴露途径,AgNO3处理的迁移系数均大于AgNP 处理。本研究表明暴露途径和Ag形态均会对大豆新 叶中Ag的积累量及转运过程产生影响,因而在评估 AgNP 对农作物生长的风险时,应综合考虑其暴露途 径和Ag 的形态。

#### 参考文献:

- [1] 沈 哲,代朝猛,张亚雷.纳米材料应用对环境的潜在风险[J].材料 导报,2012,5(26):19-23.
   SHEN Zhe, DAI Chao-meng, ZHANG Ya-lei. Nanomaterials applications: A review of their potential environmental risk[J]. Materials Review, 2012, 5(26):19-23.
- [2] Woodrow Wilson International Center for Scholars and the Pew Charitable Trusts. The Project on Emerging Nanotechnologies. http://www. nanotechproject.org/cpi/browse/nanomaterials/silver-nanoparticle/, 2014.
- [3] Guo H Y, Zhang Z Y, Xing B S, et al. Analysis of silver nanoparticles in antimicrobial products using surface - enhanced raman spectroscopy (SERS)[J]. Environmental Science and Technology, 2015, 49(7):4317-4324.
- [4] 彭小凤,朱 敏,任 洁,等.纳米银的植物毒性研究进展[J]. 生态毒 理学报, 2014, 9(2): 199-204.
  PENG Xiao-feng, ZHU Min, REN Jie, et al. Research progress in phytotoxicity of silver nanoparticles[J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2014, 9(2): 199-204.
- [5] Hou L, Li K, Ding Y, et al. Removal of silver nanoparticles in simulated wastewater treatment processes and its impact on COD and NH<sub>4</sub> reduction[J]. Chemosphere, 2012, 87(3):248-252.
- [6] Wang Y, Westerhoff P, Hristovski K D. Fate and biological effects of silver, titanium dioxide, and  $C_{\omega}$  (fullerene) nanomaterials during simulated wastewater treatment processes[J]. Journal of Hazardous Materials, 2012, 201:16-22.
- [7] Lamsal K, Kim S W, Jung J H, et al. Inhibition effects of silver nanoparticles against powdery mildews on cucumber and pumpkin[J]. The Korean Society of Mycology, 2011, 39(1):26-32.
- [8] Gottschalk F, Sonderer T, Scholz R W, et al. Modeled environmental concentrations of engineered nanomaterials (TiO<sub>2</sub>, ZnO, Ag, CNT, Fullerenes) for different regions[J]. Environmental Science & Technology, 2009, 43(24):9216-9222.
- [9] Geisler-Lee J, Wang Q, Yao Y, et al. Phytotoxicity, accumulation and transport of silver nanoparticles by Arabidopsis thaliana[J]. Nanotoxi-

#### 2016 年 12 月 陈院真,等: AgNP 叶面和根系暴露对大豆(Glycine max L. xudou16) 吸收及转运的影响

cology, 2012, 7(3):323-337.

- [10] Stegemeier J P, Schwab F, Colman B P, et al. Speciation matters: Bioavailability of silver and silver sulfide nanoparticles to alfalfa(Medicago sativa)[J]. Environmental Science & Technology, 2015, 49(14): 8451-8460.
- [11] Wang P, Menzies N W, Lombi E, et al. Silver sulfide nanoparticles (Ag<sub>2</sub>S-NPs) are taken up by plants and are phytotoxic[J]. Nanotoxicology, 2015, 9(8):1-9.
- [12] Abd Alla M H, Nafady N A, Khalaf D M. Assessment of silver nanoparticles contamination on faba bean - Rhizobium leguminosarum, bv. viciae - Glomus aggregatum symbiosis : Implications for induction of autophagy process in root nodule[J]. Agriculture Ecosystems & Environment, 2016, 218, 163-177.
- [13] Hossain Z, Mustafa G, Sakata K, et al. Insights into the proteomic re– sponse of soybean towards Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, ZnO, and Ag nanoparticles stress[J]. Journal of Hazardous Materials, 2016, 304:291–305.
- [14] Mustafa G, Sakata K, Komatsu S. Proteomic analysis of soybean root exposed to varying sizes of silver nanoparticles under flooding stress [J]. Journal of Proteomics, 2016, 148:113-125.
- [15] Yin L, Colman B P, McGill B M, et al. Effects of silver nanoparticle exposure on germination and early growth of eleven wetland plants [J]. PloS One, 2012, 7(10):e47674.
- [16] 王 荣,刘艳丽,张 民,等.纳米银对黑麦草生长特性的影响[J]. 农业环境科学学报, 2015, 34(4):639-645.
  WANG Rong, LIU Yan-li, ZHANG Min, et al. Effects of nano-silver on growth characteristics of perennial ryegrass[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2015, 34(4):639-645.
- [17] Cui Di, Zhang P, Ma Y H, et al. Phytotoxicity of silver nanoparticles to cucumber(Cucumis sativus) and wheat(Triticum aestivum)[J]. Journal of Zhejiang University: Science A (Applied Physics & Engineering), 2014, 15(8):662-670.
- [18] 彭小凤. 纳米银对拟南芥营养生长与开花的影响[D]. 杭州:浙江工业大学, 2013:49-57.
   PENG Xiao-feng. The effects of silver nanoparticles on the vegetative growth and flowing of Arabidopsis thaliana[D]. Hangzhou: Zhejiang U-niversity of Technology, 2013:49-57.
- [19] Jo Y K, Kim B H, Jung G. Antifungal activity of silver ions and nanoparticles on phytopathogenic fungi[J]. Plant Disease, 2009, 93 (10):1037-1043.
- [20] Lamsal K, Kim S W, Jung J H, et al. Inhibition effects of silver nanoparticles against powdery mildews on cucumber and pumpkin[J]. Mycobiology, 2011, 39(1):26-32.
- [21] Maurer Jones M A, Gunsolus I L, Murphy C J, et al. Toxicity of engineered nanoparticles in the environment[J]. Analytical Chemistry, 2013, 85(6): 3036-3049.

- [22] Larue C, Castillo Michel H, Sobanska S, et al. Foliar exposure of the crop Lactuca sativa, to silver nanoparticles: Evidence for internalization and changes in Ag speciation[J]. Journal of Hazardous Materials, 2014, 264(2):98-106.
- [23] Dimkpa C O, McLean J E, Martineau N, et al. Silver nanoparticles disrupt wheat(Triticum aestivum L.) growth in a sand matrix[J]. Environmental Science & Technology, 2013, 47(2):1082-1090.
- [24] Leopold N, Lendl B. A new method for fast preparation of highly surface-enhanced raman scattering(SERS) active silver colloids at room temperature by reduction of silver nitrate with hydroxylamine hydrochloride[J]. Journal of Physical Chemistry B, 2003, 107(24):5723-5727.
- [25] Li C C, Wang Y J, Dang F, et al. Mechanistic understanding of reduced AgNP phytotoxicity induced by extracellular polymeric substances[J]. Journal of Hazardous Materials, 2016, 308:21–28.
- [26] Abraham P M, Barnikol S, Baumann T, et al. Sorption of silver nanoparticles to environmental and model surfaces[J]. Environmental Science & Technology, 2013, 47(10):5083-5091.
- [27] Kaveh R, Li Y S, Ranjbar S, et al. Changes in Arabidopsis thaliana gene expression in response to silver nanoparticles and silver ions[J]. Environmental Science & Technology, 2013, 47(18):86–94.
- [28] Li C C, Dang F, Long C, et al. Integration of metal chemical forms and subcellular partitioning to understand metal toxicity in two lettuce (Lactuca sativa, L.) cultivars[J]. Plant & Soil, 2014, 384(1/2):201-212.
- [29] 杨新萍, 赵方杰. 植物对纳米颗粒的吸收、转运及毒性效应[J]. 环境 科学, 2013, 34(11):4495-4502.

YANG Xin -ping, ZHAO Fang -jie. A review of uptake, translocation and phytotoxicity of engineered nanoparticles in plants[J]. Environmental Science, 2013, 34(11):4495-4502.

- [30] Lee W M, Jin I K, An Y J. Effect of silver nanoparticles in crop plants Phaseolus radiatus and Sorghum bicolor: Media effect on phytotoxicity [J]. Chemosphere, 2012, 86(5):491-499.
- [31] Hong J, Peralta-Videa J R, Rico C, et al. Evidence of translocation and physiological impacts of foliar applied CeO<sub>2</sub> nanoparticles on cucumber (Cucumis sativus) plants[J]. Environmental Science and Technology, 2014, 48(8):4376-4385.
- [32] Eichert T, Kurtz A, Steiner U, et al. Size exclusion limits and lateral heterogeneity of the stomatal foliar uptake pathway for aqueous solutes and water-suspended nanoparticles[J]. Physiologia Plantarum, 2008, 134(1):151-160.
- [33] Wang J, Koo Y, Alexander A, et al. Phytostimulation of poplars and Arabidopsis exposed to silver nanoparticles and Ag<sup>+</sup> at sublethal concentrations[J]. Environmental Science & Technology, 2013, 47(10): 5442-5449.